

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин, 2019
УДК 611.817.1.018:616.367-007.271:599.323.4

С. В. Емельянчик¹, О. А. Карнюшко², С. М. Зиматкин²

НЕЙРОГЛОБИН В ГРУШЕВИДНЫХ НЕЙРОНАХ МОЗЖЕЧКА КРЫС ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

¹ Кафедра зоологии и физиологии человека и животных (зав. — канд. мед. наук С. В. Емельянчик), УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь

Цель — оценить содержание нейроглобина в грушевидных нейронах мозжечка в динамике экспериментального холестаза у крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на парафиновых срезах коры мозжечка, обработанных для иммуногистохимического выявления нейроглобина в грушевидных нейронах у 60 беспородных белых крыс-самцов массой 200–250 г после экспериментального воздействия. Подопытным животным проводили перевязку общего желчного протока, контрольным — ложную операцию, не препятствующую физиологическому оттоку желчи в двенадцатиперстную кишку.

Результаты. Установлено, что после перевязки общего желчного протока содержание нейроглобина в перикарионах грушевидных нейронов мозжечка меняется волнообразно: оно значительно снижено на 2–20-е сутки опыта (минимум на 5–10-е сутки) в условиях холестаза, а на 45–90-е сутки в условиях самоустранения холестаза — повышено (максимум на 45-е сутки).

Выводы. После перевязки общего жёлчного протока экспрессия нейроглобина в перикарионах грушевидных нейронов мозжечка меняется волнообразно: она значительно понижена в условиях холестаза и повышается при самоустранении холестаза.

Ключевые слова: мозжечок, грушевидные нейроны, нейроглобин, холестаз, крысы

Холестаз, или застой желчи в желчевыводящих путях, нарушающий её отток из печени в двенадцатиперстную кишку и наступающий в результате желчекаменной болезни или другой патологии гепатобилиарной системы, в настоящее время широко распространён. Он сопровождается значительными нарушениями структуры и функций головного мозга и, в частности, вызывает повреждение митохондрий нейронов и, тем самым, вызывает окислительный стресс [2]. Поэтому актуальным является изучение механизмов эндогенной нейропротекции при данной патологии и, в частности, роли белка нейроглобина (Ngb). Он служит для депонирования и переноса кислорода к митохондриям нейронов, а при патологии предотвращает нейродегенерацию через антиоксидантные и антиапоптотические механизмы. Ngb участвует в транспорте кислорода и свободных радикалов в нейронах, способствуя поддержанию кислородного гомеостаза мозга при различных воздействиях. Он связывает и нейтрализует активные формы кислорода и азота, количество которых увеличивается при развитии

оксидативного стресса, ишемии/гипоксии мозга, выступая как нейропротектор и регулятор клеточного дыхания [6]. Он обеспечивает защиту мозга от повреждений при ишемии — реперфузии благодаря своим антиоксидантным свойствам [9]. Ngb распознает ряд белков, участвующих в нескольких метаболических путях, включая поддержание ионного гомеостаза, энергетического метаболизма, функций митохондрий (апоптоз) и передачу клеточных сигналов. Нейрозащитные эффекты нейроглобина сводятся к шести основным путям, которые хорошо и подробно изложены в обзорах [16]. Нейроглобин экспрессируется в нейронах центральной и периферической нервной системы [7, 9], в том числе и в грушевидных нейронах (ГН) мозжечка [1, 6]. В наших предыдущих исследованиях установлено, что экспериментальный холестаз у крыс вызывает раннее повреждение митохондрий, глубокие структурные и метаболические нарушения в гистаминергических нейронах гипоталамуса [5], нейронах коры большого мозга [4], а также в ГН мозжечка, приводящие к их гибели

Сведения об авторах:

Емельянчик Сергей Владимирович (e-mail: semel@grsu.by), кафедра зоологии и физиологии человека и животных, УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы», 230012, Беларусь, г. Гродно, пер. Доватора, 3/1

Карнюшко Ольга Анатольевна, Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: smzimatkina@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230015, Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80

ли [3]. Экспрессия нейроглобина в этих условиях не изучалась.

Цель настоящей работы — оценка содержания нейроглобина в ГН мозжечка в разные сроки экспериментального холестаза у крыс.

Материал и методы. В работе использован материал от 60 беспородных белых крыс-самцов массой 200 ± 25 г. На проведение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.01.2017 г.). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Крысам контрольной группы проводили лапаротомию без перевязки желчного протока. Подопытным животным производили перевязку общего желчного протока (ОЖП) на 3–5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 сут в утренние часы для синхронизации по времени животных выводили из эксперимента декапитацией. Быстро извлекали головной мозг. Для получения сопоставимых результатов кусочки коры мозжечка всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Кусочки фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при $+4$ °C в течение 20 ч, а затем заключали в парафин. Стандартные парафиновые срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла.

Для иммуногистохимического выявления нейроглобина применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Neuroglobin antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600 при $+4$ °C, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436).

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Для исследования выбирали стандартные участки коры мозжечка (Ansisiform lobule — Crus1; bregma — от $-10,08$ до $-12,72$ мм) [12].

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный № 31415926535897). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна—Уитни для независимых выборок (Mann—Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования. Результаты иммуногистохимического исследования нейроглобина в коре мозжечка крысы показали, что в молекулярном слое определяется умеренное гомогенное темно-коричневое иммуногистохимическое окрашивание цитоплазмы звёздчатых и корзинчатых нейронов на фоне слабо окрашенного нейропиля. В цитоплазме ГН продукты реак-

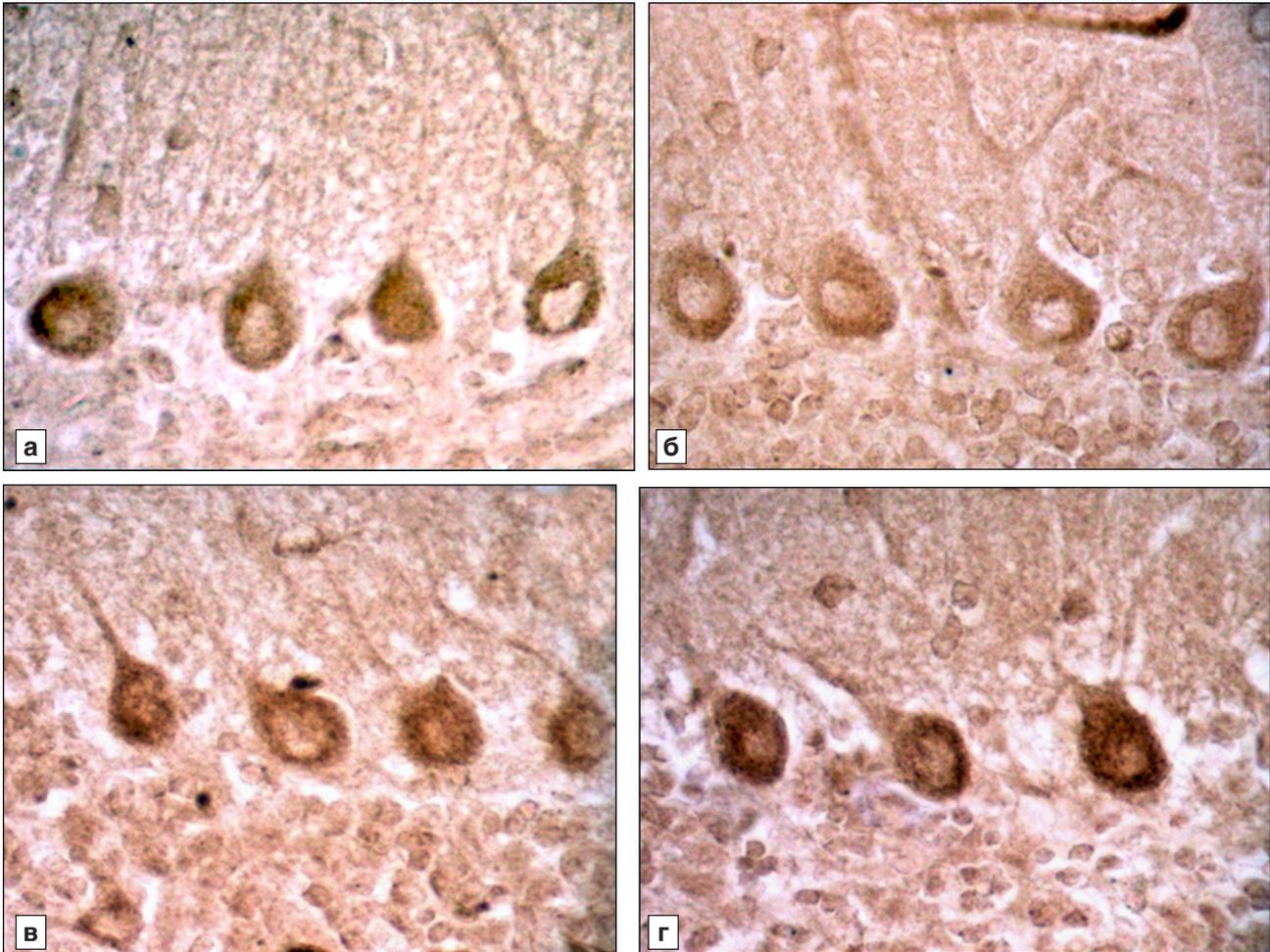
ции располагаются гомогенно либо в виде мелких гранул, относительно равномерно распределенных по цитоплазме. В тех местах, где в срез попал апикальный дендрит, также прослеживается иммуногистохимическое окрашивание на некотором его протяжении. Содержание нейроглобина в цитоплазме перикарионов ГН даже у контрольных крыс значительно варьирует (рисунки, а, в).

При этом средняя интенсивность иммуноокрашивания в разные сроки исследования варьировала незначительно (таблица). Ядра ГН иммунонегативны. В зернистом слое наблюдается умеренное иммуноокрашивание цитоплазмы нейронов, по размерам и локализации соответствующих клеткам Гольджи и клеткам-зернам.

Установлено, что в цитоплазме перикарионов ГН мозжечка у подопытных животных через 2, 5 и 10 сут после перевязки общего жёлчного протока происходит снижение содержания нейроглобина на 14,9, 23,5 и 24,7 % соответственно (см. рисунок, б; таблицу). На 20-е сутки содержание нейроглобина снижается на 8,9 %, а на 45-е сутки, напротив, увеличивается на 17,8 %, эта же тенденция сохраняется и на 90-е сутки — увеличение на 7,8 % (см. рисунок, г; таблицу).

Обсуждение полученных данных. Результаты настоящего исследования показали, что распределение иммунореактивности Ngb в структурах коры мозжечка крысы в целом соответствует таковому у человека [1]. Вместе с тем, у крысы умеренная Ngb-иммунореактивность обнаружена и в цитоплазме нейронов молекулярного и зернистого слоёв. После перевязки ОЖП по мере нарастания холестаза интенсивность иммуногистохимического окрашивания Ngb в цитоплазме перикарионов ГН мозжечка уменьшается, достигая минимальных значений на 10-е сутки. Эти изменения хорошо коррелируют с нарастающими (на 2–10-е сутки после перевязки ОЖП) морфофункциональными нарушениями в этих нейронах (структурными, ультраструктурными и гистохимическими), приводящими к гибели до 14 % ГН, что свидетельствует о срыве адаптации нейронов мозга и организма в целом [3]. Это сопровождается гибелью значительной части экспериментальных животных [2]. Как известно, нейроны из-за их высоких энергетических потребностей зависят от митохондрий, а дисфункция этих органелл играет ключевую роль в нарушении функций и гибели нейронов при острых и хронических заболеваниях центральной нервной системы, нейродегенерации [8, 10].

В наших предыдущих исследованиях показано, что первые нарушения среди органелл ГН моз-



Содержание нейроглобина в коре мозжечка крыс в контроле — а, в (5 и 45 сут после ложной операции), ее уменьшение через 5 (б) и увеличение через 45 (г) сут после перевязки общего желчного протока.

Иммуногистохимическая реакция. Цифровая микрофотография. Ув. 400

жечка при экспериментальном холестазах у крыс наблюдаются именно в митохондриях и состоят в разрушении их мембран, крист, набухании матрикса, снижении активности маркерных ферментов [3]. Поэтому мы полагаем, что одной из причин нейродегенерации и гибели нейронов при холестазах является раннее повреждение митохондрий. Возможно, эти нарушения в митохондриях нейронов связаны с уменьшением содержания в цитоплазме нейронов изучаемого кислородзапасяющего и транспортирующего белка Ngb [7].

В наших предыдущих исследованиях также установлено, что на 45–90-е сутки после перевязки ОЖП у выживших животных в связи с прорастанием обходных желчевыводящих путей происходит нормализация структурных и гистохимических параметров в сохранившихся ГН мозжечка, в частности, состояния митохондрий и активности их маркерных ферментов [3]. Это совпадает по времени с накоплением нейроглобина в цитоплазме

этих нейронов, что можно рассматривать как адаптационное изменение, направленное на повышение устойчивости нейронов к гипоксии, окис-

Экспрессия нейроглобина в перикарионах грушевидных нейронов коры мозжечка контрольных крыс и различные сроки подпеченочного холестаза (ед.×10³) (Me±IQR)

Продолжительность постоперационного периода, сут	Контрольная группа крыс	Группа крыс с холестазами	Z
2	319,33±48,53	271,68±29,03 * ↓	4,78
5	325,75±21,72	249,12±40,70 * ↓	6,19
10	316,78±39,20	238,60±93,59 * ↓	5,45
20	322,13±22,36	293,47±12,88 * ↓	4,87
45	317,88±30,52	374,34±20,0 * ↑	-5,77
90	327,67±38,56	353,20±17,83 * ↑	-4,37

* Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0,001$.

Примечание. Каждая группа состояла из 30 животных. ↓ — снижение изучаемого параметра; ↑ — увеличение изучаемого параметра; Z — Z-критерий Фишера.

лительному стрессу и нейродегенерации [9]. Подобное явление установлено и при изучении последствий экспериментальной ишемии головного мозга. Предполагают, что нейроглобин является важным фактором нейропротекции именно в отдаленные сроки ишемии [13]. У мышей после черепно-мозговой механической травмы показано, что избыточная экспрессия нейроглобина снижала сенсомоторный дефицит в отдаленные сроки после травмы [14]. Содержание Ngb было ниже в структурах спирального органа, имеющих признаки патологии, что предполагает участие Ngb в защитных механизмах при патологии внутреннего уха и наличии окислительного стресса. Предполагают, что Ngb проявляет своё протективное действие и посредством регуляции уровня апоптоза клеток мозга, связываясь с митохондриальными белками [6]. Молекулярные механизмы нейрозащитного действия нейроглобина при разных патологических состояниях в настоящее время интенсивно изучаются [16].

Вместе с тем, вопрос о возможности количественной оценки интенсивности иммуногистохимической реакции (фотометрического определения оптической плотности продукта реакции) остаётся дискуссионным. Это связано с тем, что оптическая плотность наиболее часто используемого в иммуногистохимии хромогена диаминобензидина (ДАВ) не всегда соответствует концентрации определяемого продукта. Это связано с оптическими свойствами самого ДАВ, который в высоких концентрациях не является истинным абсорбентом света, но может рассеивать его. Это значит, что он не следует закону Ламберта—Бэра, который описывает линейное соотношение между концентрацией вещества и его поглощающей способностью или оптической плотностью [15]. Действительно, эта погрешность возникает при высоких концентрациях ДАВ (тёмно-коричневая окраска структур), но когда интенсивность окраски умеренная и низкая (оптическая плотность хромогена ниже 0,6 единиц), то количественная оценка интенсивности окраски вполне возможна [11]. Поскольку в нашей работе средняя оптическая плотность иммунореактивных структур не превышала 0,35 единиц, полученные результаты можно считать значимыми. Следует отметить, что подобное ограничение существует и для продуктов большинства других гистохимических реакций.

Таким образом, после перевязки ОЖП экспрессия нейроглобина в перикарионах ГН мозжечка меняется волнообразно: она значительно понижена в условиях холестаза на 2–20-е сутки

после перевязки ОЖП (минимум на 5–10-е сутки) и повышена при самоустранении холестаза на 45–90-е сутки опыта (максимум на 45-е сутки).

Источник финансирования: бюджетные средства и средства университета на экспериментальных животных и реактивы.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: С. М. З., С. В. Е.

Сбор и обработка материала: О. А. К., С. В. Е.

Статистическая обработка данных: С. В. Е.

Написание и редактирование текста: С. В. Е., С. М. З.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е.Г., Григорьев И.П., Кирик О.В., Алексеева О.С., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э. Распределение нейроглобина в коре мозжечка человека (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 4. С. 75–77 [Gilerovich E.G., Grigor'ev I.P., Kirik O.V., Alekseeva O.S., Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E. Neuroglobin distribution in the human cerebellar cortex (an immunohistochemical study) // Morfologija. 2014. Vol. 146, № 4. P. 75–77. In Russ.].
2. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Мозг при холестазах. Гродно: ГрГУ, 2011. 265 с. [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Brain after cholestasis. Grodno: Grodnenskiĭ gosudarstvennyi universitet, 2011. 265 p. In Russ.].
3. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинью мозжечка крыс при холестазах // Морфология. 2013. Т. 143, № 2. С. 19–23 [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Structural and histochemical changes in the rat cerebellum Purkinje cells after cholestasis // Morfologija. 2013. Vol. 143, № 2. P. 19–23. In Russ.].
4. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Структурные и метаболические изменения в нейронах теменной коры мозга крыс при отведении желчи // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 2. С. 7–12 [Emel'yanchik S.V., Zimatkin S.M. Structural and histochemical changes in rat parietal cerebral cortex neurons subjected to biliary drainage // Morfologija. Vol. 141, № 2. P. 7–12. In Russ.].
5. Зиматкин С.М., Барабан О.В., Емельянчик С.В. Метаболические изменения в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике подпеченочного холестаза // Морфология. 2007. Т. 132, вып. 4. С. 27–30 [Zimatkin S.M., Baraban O.V., Emel'yanchik S.V. Metabolic changes in rat brain histaminergic neurons in dynamics of subhepatic cholestasis // Morfologija. 2007. Vol. 132, № 4. P. 27–30. In Russ.].
6. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. и др. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб.: СпецЛит, 2016. 143 с. [Korzhevskij D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V. et al. Immunohistochemical study of the brain / ed. D. Je. Korzhevskij. Sankt-Petersburg: SpetsLit, 2016. 143 p. In Russ.].
7. Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. Vertebrate globin expressed in the brain // Nature. 2000. Vol. 407, № 6803. P. 520–523.

8. Galluzzi L., Blomgren K., Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. Vol. 10, № 7. P. 481–494.
9. Li R.C., Guo S.Z., Lee S.K., Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2010. Vol. 30, № 11. P. 1874–1882. doi: 10.1038/jcbfm.2010.90
10. Lin M.T., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Nature.* 2006. Vol. 443, № 7113. P. 787–795.
11. Mansfield J.R. Multispectral imaging: a review of its technical aspects and applications in anatomic pathology // *Vet. Path.* 2014. Vol. 51, № 1. P. 185–210. doi: 10.1177/0300985813506918
12. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th ed. London: Academic Press, 2007. 448 p.
13. Ren C., Wang P., Wang B., Li N., Li W., Zhang C., Jin K., Ji X. Limb remote ischemic pre-conditioning in combination with post-conditioning reduces brain damage and promotes neuroglobin expression in the rat brain after ischemic stroke // *Restor. Neurol. Neurosci.* 2015. Vol. 33, № 3. P. 369–379.
14. Taylor J.M., Kelley B., Gregory E.J., Berman N.E. Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury // *Neurosci. Lett.* 2014. Vol. 577. P. 125–129.
15. Van der Loos C.M. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging // *J. Histochem. Cytochem.* 2008. Vol. 56, № 4. P. 313–328. doi: 10.1369/jhc.2007.950170
16. Xie L. K., Yang S. H. Brain globins in physiology and pathology // *Med. Gas. Res.* 2016. Vol. 6, № 3. P. 154–163.

Поступила в редакцию 21.02.2018
Получена после доработки 19.04.2018

NEUROGLOBIN IN CEREBELLAR PURKINJE CELLS OF RATS WITH CHOLESTASIS

*S. V. Yemelyanchik*¹, *O. A. Karnyushko*²,
*S. M. Zimatkin*²

Objective — to estimate the content of neuroglobin in cerebellar Purkinje cells in the dynamics of experimental cholestasis in rats.

Materials and methods. The study was performed on the cerebellar cortex paraffin sections processed for immunohistochemical detection of neuroglobin in Purkinje neurons, obtained from 60 outbred albino male rats, weighing 200–250 g, after an experimental intervention. Experimental animals were subjected to the common bile duct ligation; control animals underwent sham operation that did not prevent the physiological bile outflow into the duodenum.

Results. It was found that after the common bile duct ligation, the content of neuroglobin in the cerebellar Purkinje cell perikarya fluctuated in a wave-like manner: it was significantly reduced at days 2–20 of the experiment (with the minimum at days 5–10) under conditions of cholestasis, and increased at days 45–90, after cholestasis self-healing (with the maximum at day 45).

Conclusions. After the common bile duct ligation, the neuroglobin expression in the cerebellar Purkinje cell perikarya fluctuated in a wave-like manner: it decreased significantly in cholestasis and increased after its self-healing.

Key words: *cerebellum, Purkinje cells, neuroglobin, cholestasis, rats*

¹ Department of Zoology and Human and Animal Physiology, Yanka Kupala Grodno State University, 3/1 Dovatora Ln., Grodno 230012, Belarus; ² Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, 80 Gorkiy St., Grodno 230015, Belarus